

Tabela 4

Ranking 10 buhajów ocenionych genomowo mających najwyższy indeks PF w kolejnych sezonach ocen

Ranking	2014.3					Zmiana rankingu*	2015.1					Zmiana rankingu*	2015.2				
	nazwa	rok urodz.	PF	właściciel			nazwa	rok urodz.	PF	właściciel			nazwa	rok urodz.	PF	właściciel	
1	ODEON	2012	146	WCHiRZ	N	MAGIC MCHRZ	2014	147	MCHiRZ	N	PART	2014	150	WCHiRZ			
2	INDIR	2012	144	SHiUZ	N	VH SATURN	2013	147	PH KONRAD	↑	POWERBOSS	2014	150	WCHiRZ			
3	MONDOS	2010	143	WCHiRZ	N	POWERBOSS	2014	145	WCHiRZ	↑	SUPERGEN ET	2013	147	WCHiRZ			
4	GEAR PM	2011	143	SHiUZ	↓	INDIR	2012	144	SHiUZ	↓	VH SATURN	2013	146	PH KONRAD			
5	DOBERPOL	2011	143	SHiUZ	↓	GEAR PM	2011	143	SHiUZ	BZ	GEAR PM	2011	145	SHiUZ			
6	OLIWIER	2012	142	SHiUZ	↑	DECK	2013	142	SHiUZ	↑	ORBITAL	2011	145	SHiUZ			
7	ORBITAL	2011	142	SHiUZ	N	MARKIZ MCHRZ	2014	142	MCHiRZ	↑	SUDBER	2013	145	SHiUZ			
8	BORDER	2012	142	SHiUZ	↑	IMPERATOR ET	2013	142	WCHiRZ	↓	MAGIC MCHRZ	2014	145	MCHiRZ			
9	NAPIER	2011	141	WCHiRZ	↓	ODEON	2012	142	WCHiRZ	↑	BORDER	2012	144	SHiUZ			
10	SPLENDOR	2013	141	MCHiRZ	↓	MONDOS	2010	142	WCHiRZ	N	GILMOUR	2014	143	SHiUZ			
Średni			143					144					146				

\*Pozycja w rankingu w stosunku do poprzedniej wyceny: N – nowość, BZ – bez zmian, ↓ – spadek, ↑ – wyżej

MCHiRZ w Łowiczu, z indeksem PF 147, a w sezonie 2014/3 – buhaj ODEON z indeksem PF 146, który, tak jak obecny lider, należy do WCHiRZ w Poznaniu.

Czołówka wyceny 2015/1 – buhaje MAGIC MCHRZ, VH SATURN, POWERBOSS i GEAR PM zajmują w obecnej ocenie genomowej odpowiednio miejsca: 8., 4., 2. i 5., a więc nadal plasują się w pierwszej dziesiątce. Pozostałe buhaje w rankingu 2015/2 obniżyły swoją pozycję w stosunku do pozycji w rankingu 2015/1. Buhaj INDIR z pozycji 4. spadł na 12. (PF 143), buhaj DECK z 6. lokaty uplasował się w trzeciej dziesiątce, na pozycji 28. (PF 140), MARKIZ MCHRZ był 7., a obecnie jest aż 35. (PF 140), buhaje IMPERATOR, ODEON i MONDOS z 8., 9. i 10. lokaty spadły na odpowiednio 18., 20. i 26. pozycję, z indeksami PF: 142, 142 i 140. Nie zawsze spadek lokaty buhaja w rankingu oznacza, że jeżeli wybraliśmy danego rozplodnika do inseminacji, to dokonaliśmy złego wyboru. Często jest tak, że indeks PF buhaja nie zmienia się w kolejnej ocenie tylko dochodzą nowe, znacznie lepsze zwierzęta i spychają inne na gorszą pozycję. Jest to pozytywne zjawisko, bo oznacza, że jest postęp w hodowli i selekcji bydła.

W ocenie 2014/3 z 10 najwybitniejszych buhajów aż 6 należało do SHiUZ w Bydgoszczy, 3 – do WCHiRZ w Poznaniu oraz 1 – do MCHiRZ w Łowiczu. W kolejnej ocenie 2015/1 proporcje nieco się zmieniły na korzyść Spółki w Poznaniu, która była właścicielem 4 buhajów, Spółka w Bydgoszczy – 3, Spółka w Łowi-

czu – 2, a PH Konrad – 1. W aktualnej ocenie najwięcej buhajów na TOP 10 ma SHiUZ w Bydgoszczy – 5 szt., WCHiRZ w Poznaniu – 3 szt., a MCHiRZ w Łowiczu i PH Konrad – po 1 szt.

Z każdą wyceną do rozrodu dopuszczone jest coraz młodsze pokolenie buhajów. W obecnej ocenie aż 4 buhaje urodzone są w 2014 roku.

#### Podsumowanie

Analiza publikacji sierpniowych wyników wartości hodowlanej buhajów z oceną genomową pokazała:

- nowy wzrost średniej wartości hodowlanej buhajów ocenionych na podstawie genomu; po raz pierwszy 2 buhaje mają PF o wartości 150 jednostek;
- jeszcze raz znaczną przewagę buhajów wycenionych na podstawie genomu nad buhajami z oceną konwencjonalną: PF większy o 15 jednostek;
- coraz większy wybór dla hodowców w populacji buhajów genomowych: 39 buhajów z PF  $\geq 140$  i 99 buhajów z PF  $\geq 136$ ;
- dużą różnorodność genetyczną w populacji 100 i 10 najlepszych buhajów.

Biorąc pod uwagę te wyniki, można śmiało powiedzieć, że sytuacja ta pozwala polskim hodowcom na szerokie wykorzystanie tych buhajów do kojarzeń zarówno krów, jak i jałówek, i powiększenie postępu genetycznego ich stad.

## Substytuty roślinne białka zwierzęcego w kriokonserwacji nasienia knura

Monika Trzcńska, Magdalena Bryła

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy w Krakowie

Kriokonserwacja materiału biologicznego jest jedną z technologii pozwalających na zachowanie genetycznie uwarunkowanej różnorodności. Dotyczy to przechowywania nasienia, zarodków, oocytów czy komórek somatycznych. Mrożenie nasienia pozwa-

la na racjonalne sterowanie rozrodem oraz kontrolę nad postępowaniem genetycznym. Czas przechowywania i wykorzystania do inseminacji nasienia poddanego kriokonserwacji jest nieograniczony. Stwarza to możliwość wykorzystania materiału genetycznego pochodzącego od szczególnie cennych osobników. Łatwy transport nasienia mrożonego daje możliwość zachowania materiału genetycznego wartościowych pod względem hodowlanym samców i powoduje, że zamrożone nasienie staje się przedmiotem wymiany między hodowcami, zwłaszcza w obrocie międzynarodowym.

Kriokonserwacja nasienia knura nie jest metodą standardowo stosowaną w rozrodzie świń. Pomimo prowadzenia intensywnych badań nad opracowaniem skutecznej metody kriokonserwacji, użycie mrożonego nasienia knura w praktyce jest bardzo ograniczone i kształtuje się w skali światowej poniżej 1% ogólnej liczby wykonywanych zabiegów inseminacyjnych. Istotnym problemem w kriokonserwacji jest zróżnicowana indywidualna podatność nasienia knurów na proces zamrażania-rozmrażania. Oprócz zmienności osobniczej pomiędzy poszczególnymi samcami, wykazano również różnice w zamrażalności między eja-

kulatami od tego samego osobnika. Niskie wskaźniki rozrodu uzyskiwane po inseminacji loch nasieniem mrożonym wynikają głównie z faktu, że błona komórkowa plemników knura charakteryzuje się dużą podatnością na uszkodzenia kriogeniczne [4].

W doskonaleniu technologii krio-konserwacji nasienia knura ważne jest wprowadzanie do składu rozcieńczalnika komponentów o właściwościach osłaniających błony plazmatyczne plemników przed uszkodzeniami kriogenicznymi. W związku z tym, jako główny składnik rozcieńczalnika mrożeniowego powszechnie stosuje się żółtko jaja kurzego. Składnik ten stanowi jednak kontrowersyjny element rozcieńczalnika, zawiera bowiem komponenty, które są potencjalnymi nośnikami patogenów. Stąd w praktyce konserwacji stosowane są komercyjne rozcieńczalniki nie zawierające składników pochodzenia zwierzęcego [3] lub zawierające ich substytuty w postaci białek roślinnych. Białko roślinne jest znacznie bezpieczniejszym suplementem pod względem sanitarnym niż komponenty pochodzenia zwierzęcego. Zastosowanie białka roślinnego eliminuje bowiem możliwość przenoszenia chorób zakaźnych pochodzenia zwierzęcego oraz zanieczyszczeń mikrobiologicznych. Jednocześnie w porównaniu do surowicy zwierzęcej białka te nie wykazują zmienności pomiędzy wyprodukowanymi seriami, co umożliwia standaryzację warunków doświadczenia. Z badań przeprowadzonych przez Beccaglia i wsp. [2] na nasieniu wilka wynika, że dodatek lecytyny sojowej do rozcieńczalnika mrożeniowego działa ochronnie na błonę plazmatyczną plemników. Z kolei badania przeprowadzone przez Aires i wsp. [1] wykazały, że rozcieńczalnik mrożeniowy zawierający lecytynę sojową wpływa korzystnie na ruchliwość plemników buhaja po rozmrożeniu i wzrost odsetka zacielonych jałówek.

W Dziale Biotechnologii Rozrodu Zwierząt IZ-PIB przeprowadzono badania mające na celu przygotowanie modyfikacji składu rozcieńczalnika mrożeniowego poprzez zastąpienie żółtka jaja kurzego mieszaniną białek roślinnych i/lub lecytyną sojową.

W celu modyfikacji składu rozcieńczalnika laktozowego do badań przeznaczono nasienie pochodzące od 5 knurów (3-4 ejakulatory od knura). Kriokonserwację przeprowadzono według metody własnej [5]. Odczynniki potrzebne do przygotowania rozcieńczalników mrożeniowych pochodziły z firmy Sigma-Aldrich (Niemcy), z wyjątkiem mieszaniny białek roślinnych i lecytyny sojowej pochodzących z firmy Animal Pharma BV (Holandia) oraz rozcieńczalnika *Biosolwens Plus* (Biocheffa, Polska). Nasienie (frakcja gęsta) pobierano metodą manualną na fantomie i rozrzedzano w rozcieńczalniku *Biosolwens Plus*, w stosunku 1:1. Ocenę ruchliwości, koncentracji i morfologii przeprowadzono przy zastosowaniu systemu CASA (SM-CMA; MTM, Szwajcaria). Kryterium kwalifikującym ejakulatory do kriokonserwacji było stwierdzenie co najmniej 70% plemników ruchliwych oraz 80% plemników morfologicznie prawidłowych. Rozrzedzone nasienie schładzano do temperatury 15°C i ekwilibrowano przez 60 minut. W celu oddzielenia plemników od osocza i rozcieńczalnika wirowano nasienie w wirówce w temperaturze 15°C, przy 800 g, przez 25 minut. Zawiesinę plemników rozrzedzano do koncentracji 1,5x10<sup>9</sup> plemników/ml przy użyciu następujących rozcieńczalników:

- żółtkowo-laktozowego: 80 ml 11% roztworu laktozy (L) + 20 ml żółtka jaja kurzego (LEYG);
- laktozowego: 11% roztworu laktozy (L) z dodatkiem:

**Tabela 1**

**Ocena jakości nasienia świeżego przeznaczonego do kriokonserwacji**

Nasienie świeże	Ruch plemników (%)		JC-1	YO-PRO-1/PI		FITC-PNA/PI
	całkowity	postępowy	wysoki ΔYm	YO-PRO-1/PI <sup>-</sup>	YO-PRO1 <sup>+</sup> /PI <sup>-</sup>	FITC-PNA/PI <sup>-</sup>
	91,2 ±10,3	83,4 ±9,1	92,1 ±6,7	88,5 ±6,1	3,7 ±1,5	86,8 ±6,7

ΔYm – transbłonowy potencjał mitochondrialny, YO-PRO-1/PI<sup>-</sup> – plemniki żywe, YO-PRO1<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> – plemniki apoptotyczne, FITC-PNA/PI<sup>-</sup> – plemniki żywe z integralnym akrosomem

**Tabela 2**

**Ocena jakości kriokonserwowanego nasienia knura**

Rozcieńczalnik mrożeniowy	Ruch plemników (%)		JC-1	YO-PRO-1/PI		FITC-PNA/PI
	całkowity	postępowy	wysoki ΔYm	YO-PRO-1/PI <sup>-</sup>	YO-PRO1 <sup>+</sup> /PI <sup>-</sup>	FITC-PNA/PI <sup>-</sup>
LEYG	42,6 ±7,1	37,8 ±6,2	41,2 ±9,5	38,2 ±7,4	23,7 ±3,9	35,6 ±5,1
L+0,0005Pp	29,1 ±5,3*	22,1 ±3,3*	27,5 ±4,1*	26,2 ±5,6*	23,2 ±2,1	21,1 ±6,7*
L+0,001Pp	27,7 ±4,2*	21,6 ±4,8*	19,6 ±7,5*	23,1 ±7,3*	26,7 ±2,9	21,7 ±2,8*
L+3LS	15,6 ±2,1*	19,2 ±6,3*	18,6 ±4,8*	14,8 ±9,1*	24,2 ±4,2	18,7 ±3,2*
L+9LS	28,3 ±3,4	20,1 ±3,4*	22,9 ±3,7*	26,2 ±4,2*	22,6 ±2,1	21,6 ±4,1*
L+15LS	41,2 ±4,3	36,6 ±3,4	39,7 ±2,7	39,5 ±5,9	23,1 ±4,6	32,1 ±3,7

\*p<0,05 istotne statystycznie różnice w stosunku do rozcieńczalnika kontrolnego (LEYG), ΔYm – transbłonowy potencjał mitochondrialny, YO-PRO-1/PI<sup>-</sup> – plemniki żywe, YO-PRO1<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> – plemniki apoptotyczne, FITC-PNA/PI<sup>-</sup> – plemniki żywe z integralnym akrosomem

- mieszaniny białek roślinnych i lecytyny sojowej (Pp) (stężenie: 0,0005 g/ml) – L+0,0005Pp
- mieszaniny białek roślinnych i lecytyny sojowej (Pp) (stężenie: 0,001 g/ml) – L+0,001Pp
- lecytyny sojowej (LS) (stężenie: 3%) – L+3LS
- lecytyny sojowej (LS) (stężenie: 9%) – L+9LS
- lecytyny sojowej (LS) (stężenie: 15%) – L+15LS

Osad plemników po odwirowaniu i usunięciu osocza oraz rozcieńczalnika schładzano do temperatury +4°C przez 90 minut. Po schłodzeniu próbkę mieszano w stosunku 2:1 z odpowiednim rozcieńczalnikiem (spośród wyżej wymienionych) zawierającym dodatkowo 9% glicerol, tak by końcowa koncentracja plemników wynosiła 1x10<sup>9</sup> plemników/ml, a koncentracja glicerolu 3%. Zawiesinę plemników w rozcieńczalniku umieszczano w słomkach o objętości 0,5 ml i zamrażano w parach ciekłego azotu (temperatura ok. -120°C). Po 15 minutach słomki przenoszono do ciekłego azotu.

Rozmrażanie słomek przeprowadzono w łaźni wodnej w temperaturze 37°C przez 40 sekund. Po rozmrożeniu, zawartość słomek przenoszono do rozcieńczalnika *Biosolwens Plus* o temperaturze 37°C. Ocenę jakości kriokonserwowanego nasienia przeprowadzono po 10-15 minutach inkubacji w temperaturze 37°C.

W celu oceny jakości nasienia przeprowadzono analizy przy zastosowaniu mikroskopu epifluorescencyjnego firmy Nikon Eclipse E600 (Japonia). Natychmiast po sporządzeniu preparaty analizowano pod mikroskopem fluorescencyjnym przy użyciu następujących filtrów: filtr o długości fali 520 ±20 nm – detekcja zielonej fluorescencji; filtr o długości >620 nm – detekcja czerwonej fluorescencji.

Analizę przeprowadzano na 200 plemnikach z każdej próbki.

Zastosowano następujące metody oceny jakości plemników:

- ocenę zmian w przepuszczalności błony komórkowej plemników przy zastosowaniu fluorochromu YO-PRO-1. Zmiany w przepuszczalności błony komórkowej plemników identyfikowano na podstawie charakterystycznych dla apoptozy mikropórów w zewnętrznej błonie cytoplazmatycznej za pomocą fluorochromu YO-PRO-1 (Vybrant Apoptosis Assay Kit#4, Molecular Probes Inc., Eugene, USA). Zastosowanie w tej metodzie jodku propydydny (PI) pozwoliło dodatkowo na identyfikację plemników nekrotycznych;
- ocenę mitochondrialnego potencjału transbłonowego przy zastosowaniu barwnika fluorescencyjnego JC-1. Barwnik

JC-1 (Molecular Probes, USA) służył do pomiaru zmian  $\Delta Y_m$  w komórkach. W żywych, nieapoptotycznych komórkach JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide/chloride) gromadził się w mitochondriach w postaci agregatów, co w mikroskopie fluorescencyjnym widoczne było w postaci czerwono-pomarańczowej fluorescencji, natomiast w komórkach apoptotycznych i nekrotycznych, w których nastąpiła depolaryzacja błony mitochondrialnej i spadek  $\Delta Y_m$ , gromadził się w formie monomerycznej i wybarwiał komórki na zielono.

c) ocenę stanu akrosomów plemników. Wizualizację stanu akrosomów plemników knura przeprowadzono przy zastosowaniu barwienia lektyną z orzeszków ziemnych sprzężoną z fluoresceiną (FITC-PNA/PI Sigma, USA).

Uzyskane wyniki dotyczące jakości nasienia poddano analizie statystycznej za pomocą pakietu statystycznego Statistica 6.0 (StatSoft, USA). Poziom istotności szacowano testem Duncan (Duncan Multiple Range Test).

Wyżej wymienione metody fluorescencyjne zastosowano również w celu oceny nasienia świeżego przed procedurą kriokonserwacji. Wyniki zamieszczono w tabeli 1. W nasieniu świeżym odsetek plemników żywych (YO-PRO-1/PI<sup>-</sup>), plemników apoptotycznych (YO-PRO-1<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) oraz odsetek plemników żywych z integralnym akrosomem (FITC-PNA<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>) wynosił odpowiednio: 88,5 ± 6,1%; 3,7 ± 1,5% oraz 86,8 ± 6,7%.

Wyniki modyfikacji rozcieńczalnika laktozowego na podstawie różnych stężeń mieszaniny białek roślinnych i/lub lecytyny sojowej przedstawiono w tabeli 2. Ocena plemników kriokonserwowanych w zmodyfikowanym rozcieńczalniku laktozowym wykazała, że najwyższy odsetek plemników wykazujących ruch postępowy stwierdzono w rozcieńczalniku laktozowym z dodat-

kiem 15% lecytyny sojowej (36,6 ± 3,4%). Wszystkie pozostałe modyfikacje powodowały istotny spadek ruchliwości w stosunku do kontrolnego rozcieńczalnika żółtkowo-laktozowego. Jednocześnie w rozcieńczalniku kontrolnym uzyskano najwyższy odsetek plemników z wysokim  $\Delta Y_m$  (41,2 ± 9,5%). Niezależnie od rodzaju rozcieńczalnika zastosowanego do mrożenia, udział plemników apoptotycznych (YO-PRO-1<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) wahał się od 22,6 ± 2,1 do 26,7 ± 2,9%. Najwyższy odsetek plemników żywych z integralnym akrosomem (FITC-PNA<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>) odnotowano w rozcieńczalniku kontrolnym i rozcieńczalniku laktozowym z dodatkiem 15% lecytyny sojowej (35,6 ± 5,1% vs. 32,1 ± 3,7%).

Uzyskane wyniki badań pozwalają stwierdzić, że żółtko jaja kurzego rutynowo stosowane w kriokonserwacji nasienia knura może zostać zastąpione składnikiem pochodzenia roślinnego bez obniżenia jakości nasienia po procedurze zamrażania-rozmrażania. Zastąpienie żółtka jaja kurzego w rozcieńczalniku mrożeniowym 15% lecytyną sojową pozwala na uzyskanie nasienia o parametrach porównywalnych z nasieniem kriokonserwowanym w standardowym rozcieńczalniku żółtkowo-laktozowym.

*Praca wykonana w ramach projektu badawczego N N311 524840 oraz działalności statutowej IZ-PIB, podzadanie nr. 02-5.06.1.*

**Literatura:** 1. Aires V.A., Hinsch K.D., Mueller-Schloesser F., Bogner K., Mueller-Schloesser S., Hinsch E., 2003 – Theriogenology 60, 269-279. 2. Beccaglia M., Anastasi P., Luvoni G.C., 2009 – Vet. Res. Commun. 33, 77-80. 3. Cuello C., Antonia Gil M., Parrilla I., Tornel J., Vazquez J. M., Roca J., Berthelot F., Martinat-Botte F., Martinez E. A., 2004 – Theriogenology 62, 353-361. 4. Großfeld R., Sieg B., Struckmann C., Frenzel A., Maxwell W.M., Rath D., 2008 – Theriogenology 70, 1225-33. 5. Trzcińska M., Bryła M., Gogol P., Cegła M., 2013 – Kriokonserwacja nasienia knura. ISBN 978-83-7607-296-3, s. 1-12.

## Substitution of animal protein with plant proteins in cryopreservation of boar semen

### Summary

Plant protein supplementation in extenders is hygienically safe and eliminates the risk of microbiological contamination. As one of the phospholipids, soya lecithin plays an important role in regulation of the physiological functions of the cell membrane. Moreover, like egg yolk, soya lecithin has properties protecting animal spermatozoa against cold shock during semen cryopreservation. The study was undertaken to determine the effect of adding a mixture of several plant proteins and soya lecithin (Pp) (Animal Pharma BV, the Netherlands) and soya lecithin alone (LS) (Sigma, St. Louis, MO, USA) on the quality of frozen boar semen. The following semen parameters were assessed: sperm motility, plasma membrane integrity (YO-PRO-1/PI<sup>-</sup>), mitochondrial transmembrane potential and acrosome integrity. The best result was obtained for the extender supplemented with 15% soya lecithin, with 36.6% of sperm cells exhibiting progressive motility, 39.5% with plasma membrane integrity (YO-PRO-1/PI<sup>-</sup>) and 32.1% with acrosome integrity. In conclusion, soya lecithin at a concentration of 15% can replace egg yolk extender in cryopreservation of boar semen.

**KEY WORDS:** plant proteins, soya lecithin, cryopreservation, boar

## Mikotoksyny w paszach – zagrożenie dla królików

Dorota Kowalska

Institut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy w Balicach koło Krakowa

Mikotoksyny to toksyczne, wtórne metabolity niektórych gatunków grzybów strzępkowych, należących głównie do rodzajów

*Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*. Mogą stanowić zanieczyszczenie żywności i pasz, zwłaszcza zbóż, produktów zbożowych, orzechów, nasion oleistych, mleka i mięsa. Obecnie żaden z regionów geograficznych nie jest wolny od występowania mikotoksyn. Zanieczyszczenie tymi związkami dotyka corocznie 25% światowych plonów. Niezależnie od tego, czy jest to obszar strefy umiarkowanej, subtropikalnej czy tropikalnej, jeżeli w okresie zbioru występuje wysoka wilgotność powietrza, zakażenie ziarna grzybami strzępkowymi staje się wysoce prawdopodobne. Obecnie poszczególne kraje i regiony dzieli się na obszary o wysokim i niskim ryzyku występowania określonych mikotoksyn (tab.).

Grzyby ze względu na rodzaj podłoża, na którym się rozwijają, dzieli się na szczepy fitopatogeniczne i saprofityczne. Grzyby